

KARAKTERISASI ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT DARI *MANDAI* YANG BERPOTENSI SEBAGAI PROBIOTIK

Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolates from *Mandai* Function as Probiotic

Aswita Emmawati^{1,2}, Betty Sri Laksmi Suryaatmadja Jenie², Lilis Nuraida^{2,3}, Dahrul Syah^{2,3}

¹Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Mulawarman, Kampus Gunung Kelua, Samarinda, Kalimantan Timur 75123

²Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

³Southeast Asian Food and Agriculture Science and Technology Center, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680
Email: betty_jenie@yahoo.com

ABSTRAK

Mandai merupakan pangan fermentasi yang terbuat dari dami atau bagian dalam kulit cempedak. Penelitian tentang *mandai*, khususnya bakteri yang terlibat dalam fermentasi *mandai*, masih belum banyak dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat yang diisolasi dari *mandai* serta mengevaluasi potensinya sebagai probiotik. Sampel *mandai* diperoleh dari beberapa industri rumah tangga di Kalimantan Timur, yang dibuat dengan kadar garam 5, 10 dan 15%. Delapan puluh lima isolat bakteri asam laktat diperoleh dari *mandai* pada hari ke-4, 8 dan 12 fermentasi dan dikaji sifat-sifat probiotiknya. Semua isolat menunjukkan toleransi yang baik terhadap pH rendah (pH 2,0) dengan penurunan jumlah sel hidup kurang dari 2 log cfu/ml. Isolat bakteri asam laktat dapat tumbuh dengan adanya 0,5% garam empedu walaupun jumlah sel hidupnya menurun dibandingkan dengan jumlah sel hidup pada medium tanpa garam empedu. Penurunan jumlah isolat viabel kurang dari 1 log cfu/ml teramati pada 21 isolat. Sembilan belas isolat dapat mentoleransi pH 2,0 dan garam empedu 0,5% lebih baik daripada yang lain dengan total penurunan jumlah sel hidup kurang dari 1 log cfu/ml. Sebagian besar isolat (11 dari 19) yang mentoleransi pH rendah diperoleh dari fermentasi *mandai* hari ke-8. Isolat MC812 dan MC809 mempunyai sifat antimikroba yang baik terhadap semua patogen uji (*Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Salmonella typhimurium* ATCC 14028). Sembilan isolat lain mempunyai sifat antimikroba yang baik terhadap 3 atau lebih patogen uji. Resistensi terhadap antibiotik bervariasi di antara isolat. Kesepuluh isolat diidentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* dengan API 50 CHL dan dikonfirmasi dengan *real-time*-PCR. Keseluruhan hasil mengindikasikan bahwa kesepuluh bakteri asam laktat yang diisolasi dari *mandai* berpotensi sebagai probiotik.

Kata kunci: Probiotik, bakteri asam laktat, sifat antimikroba, *mandai*, *Lactobacillus plantarum*

ABSTRACT

Mandai is a fermented product made of cempedak (*Artocarpus champeden*) dami. The research aimed to isolate and characterize lactic acid bacteria isolated from *mandai* and to evaluate their probiotic potency. *Mandai* samples were collected from several home industries in East Kalimantan area made with 5, 10 and 15% salt contents. Eighty-five lactic acid bacteria (LAB) isolates were obtained from *mandai* on day 4, 8, and 12 fermentation and assessed for their probiotic properties. All isolates showed good tolerances towards low pH (pH 2.0) with the decrease of viable counts of less than 2 log cfu/ml. The LAB isolates could grow in the present of 0.5% bile salt although the viable counts decreased as compared to those in medium without bile salt. Reduction of viable counts less than 1 log cfu/ml was observed in 21 isolates. Nineteen isolates could tolerate pH 2.0 and 0.5% bile salt better than others with the total decrease in viable counts less than 1 log cfu/ml. Most of isolates (11 out of 19 isolates) which tolerate low pH were obtained from 8 days *mandai* fermentation. Isolate MC812 and MC809 had good antimicrobial properties against *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Ten isolates had good antimicrobial properties against at least 3 pathogens tested. Their resistance toward antibiotics varied between isolates. All isolates was identified as

Lactobacillus plantarum with API 50 CHL and confirmed with real-time-PCR. The overall results indicated that certain LAB isolates obtained from *mandai* show promising probiotic properties.

Keywords: Probiotic, lactic acid bacteria, antimicrobial, *mandai*, *Lactobacillus plantarum*

PENDAHULUAN

Pangan yang diproses dengan fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat telah menjadi bagian dari khasanah kekayaan budaya tradisional kita. Salah satunya adalah makanan fermentasi khas masyarakat yang hidup di wilayah propinsi Kalimantan Tengah, Selatan dan Timur, yaitu *Mandai*. *Mandai* merupakan makanan fermentasi yang dibuat secara tradisional dari dami atau kulit buah cempedak bagian dalam yang telah dibersihkan dan direndam dalam larutan garam. *Mandai* yang telah jadi, dicuci, diberi bumbu dan dikonsumsi sebagai lauk teman nasi. Rasanya yang enak dan gurih serta teksturnya yang menyerupai daging membuat makanan ini digemari. Proses fermentasi *mandai* merupakan bagian dari upaya pengawetan makanan agar tersedia untuk waktu yang lama sekaligus upaya pemanfaatan limbah dari konsumsi buah cempedak. *Mandai* yang dibuat dengan baik, umumnya dapat bertahan hingga 1 tahun atau lebih.

Sebagai pangan fermentasi yang belum banyak dikenal, penelitian tentang *mandai* masih terbatas. Rahayu (2003) melakukan penelitian tentang mikroorganisme yang terlibat dalam pangan fermentasi tradisional Indonesia, salah satunya *mandai*, dan telah berhasil mengisolasi 9 bakteri dari *mandai*, di antaranya telah diidentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* dan *Pediococcus pentosaceus*. Kedua bakteri ini tergolong dalam kelompok bakteri asam laktat. Proses fermentasi *mandai* berikut perubahan yang terjadi selama fermentasi telah diteliti oleh Nur (2009) meliputi perubahan jumlah mikroorganisme dan bakteri asam laktat, gula tereduksi, produksi asam organik dan perubahan pH selama fermentasi.

Bakteri asam laktat merupakan kelompok besar mikroorganisme yang secara fisiologis menghasilkan asam laktat sebagai metabolit utama. Kelompok ini secara alami terdapat pada banyak bahan pangan serta saluran gastrointestinal dan urogenital manusia dan hewan. Selama pertumbuhannya, bakteri asam laktat dapat memproduksi komponen metabolit, seperti asam organik, hidrogen peroksida, bakteriosin, dan komponen lainnya. Bakteriosin merupakan suatu péptida antimikroba yang dihasilkan bakteri asam laktat selama fase pertumbuhan eksponensial yang dalam jumlah yang cukup, dapat membunuh atau menghambat bakteri lain yang berkompetisi dalam ekologi yang sama (Vasiljevic dan Shah, 2008).

Beberapa spesies dari kelompok bakteri asam laktat, terutama dari genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, telah dikarakterisasi sebagai probiotik. Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang jika dikonsumsi dalam jumlah cukup akan memberikan manfaat kesehatan bagi yang mengkonsumsinya (FAO/WHO, 2002). Mikroorganisme probiotik memberikan manfaat terhadap kesehatan manusia, melindungi dari infeksi bakteri enterik, menurunkan kejadian dan durasi diare, *necrotizing enterocolitis* (NEC) dan *inflammatory bowel disease* (Culligan dkk., 2009; Vasiljevic dan Shah, 2008).

Penyakit-penyakit gastrointestinal yang disebabkan oleh bakteri masih menjadi masalah besar dalam dunia kesehatan. Diperkirakan lebih dari 4 juta kasus diare terjadi setiap tahun dan 2,2 juta di antaranya menyebabkan kematian (WHO, 2008). Di Indonesia sendiri proporsi kematian akibat diare secara umum adalah 3,5 per seratus kematian. Untuk kelompok bayi dan balita, diare menjadi penyebab kematian tertinggi dengan proporsi 31,2% untuk bayi dan 25,2% untuk kelompok balita (Balitbangkes, 2007). Terapi antibiotik telah digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri pada saluran pencernaan manusia. Akan tetapi, meningkatnya resistensi antibiotik menjadi penyebab yang menyadarkan masyarakat terhadap penggunaan probiotik sebagai terapi alternatif untuk penyakit infeksi saluran pencernaan. Probiotik mempunyai kemampuan untuk tumbuh secara kompetitif dengan bakteri enterik, sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri enterik dalam saluran pencernaan manusia.

Sifat fungsional bakteri asam laktat bersifat spesifik strain sehingga masih perlu dilakukan eksplorasi strain bakteri asam laktat yang unggul dalam sifat fungsional tertentu. Eksplorasi sumber-sumber bakteri asam laktat dapat dilakukan pada pangan fermentasi tradisional, seperti tauco, tempoyak, pikel, sawi asin, bekasam, dan lain-lain untuk mencari isolat-isolat yang mempunyai sifat fungsional yang dapat meningkatkan kesehatan (Rahayu, 2003). Isolat yang diperoleh dapat dipergunakan sebagai kultur starter pada pangan fermentasi sehingga akan menaikkan nilai tambah produk fermentasi menjadi bernilai fungsional.

Karakterisasi dan fungsionalitas isolat-isolat bakteri asam laktat asal *mandai* masih belum dilakukan dan perlu diinvestigasi lebih lanjut untuk mengetahui kelayakan sebagai kandidat probiotik. Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan isolasi dan mengkarakterisasi isolat bakteri asam

laktat asal *mandai* sebagai bagian dari seleksi sesuai kriteria sebagai kandidat probiotik.

METODE PENELITIAN

Kultur Bakteri

Kultur bakteri, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Bacillus cereus*, dan *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 diperoleh dari SEAFast Center IPB. *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 dibeli dari Oxoid. Semua bakteri patogen kecuali *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 dipelihara dalam BHI broth. Semua isolat bakteri asam laktat dan *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 dipelihara dalam MRS broth (Oxoid, Hampshire, UK).

Pengumpulan Sampel

Tiga kelompok sampel *mandai* (9 sampel masing-masing, untuk kadar garam 5, 10 dan 15%), dikumpulkan dari 5 industri rumah tangga di Samarinda, Kalimantan Timur. Dami cempedak segar dalam larutan garam 5, 10 dan 15% dibuat oleh masing-masing industri rumah tangga setelah dipesan secara khusus. Proses pembuatan *mandai* dilakukan dengan cara sebagai berikut: dami cempedak yang telah dibersihkan dari kulit luarnya, dibubuhi garam dapur dengan konsentrasi 5, 10 dan 15% (b/v) kemudian dimasukkan ke dalam stoples yang bersih. Air ditambahkan sampai seluruh permukaan dami terendam oleh air. Wadah ditutup dan diberi beberapa lubang untuk aerasi.

Mandai yang baru dibuat dibawa ke laboratorium dan dibiarkan pada suhu ruang selama 12 hari. Kondisi fermentasi aerobik dan pada suhu ruang dilakukan sesuai kondisi fermentasi *mandai* yang sesungguhnya di produsen *mandai*. Penghitungan dan isolasi bakteri serta penentuan pH dilakukan pada hari fermentasi ke 4, 8 dan 12.

Penghitungan dan Isolasi Bakteri Asam Laktat selama Fermentasi *Mandai*

Sepuluh gram sampel, secara aseptis, dimasukkan ke dalam 90 ml larutan fisiologis (mengandung 0,85% NaCl) dan dihomogenkan. Suatu seri pengenceran (10^{-1} - 10^{-6}) dibuat untuk masing-masing sampel. Satu ml dari pengenceran yang sesuai dipupuk pada cawan dan dituang MRS agar (Oxoid, Hampshire UK) yang disuplementasi dengan 0,3% garam empedu dan 3% CaCO_3 (Merck, Darmstadt, Germany). Semua cawan diinkubasi pada 30°C selama 24-48 jam secara aerobik. Penghitungan dilakukan pada cawan yang berisi 25-250 koloni sesuai BAM (2001).

Koloni yang representatif dicuplik dari cawan dan digoreskan pada cawan berisi MRS agar. Koloni yang mempunyai morfologi berbeda dimurnikan dengan cara dicuplik dan

digoreskan kembali pada cawan baru berisi MRS agar sampai dihasilkan koloni dengan bentuk dan ukuran seragam. Satu koloni tunggal dicuplik dan digoreskan pada agar miring. Morfologi isolat diamati dengan melakukan pewarnaan Gram dan uji katalase menggunakan hidrogen peroksida 3%. Isolat dengan morfologi batang/bulat Gram positif dan katalase negatif dikonfirmasi sebagai bakteri asam laktat.

Stok kultur gliserol dibuat untuk tujuan pengawetan kultur. Masing-masing isolat diinokulasi dalam MRS broth (Oxoid, Hampshire UK) yang mengandung 30% gliserol dan disimpan pada -20°C. Kultur stok diperbaharui setelah penyimpanan 6 bulan. Untuk penyimpanan jangka panjang, dilakukan liofilisasi terhadap kultur terpilih.

Kemampuan Hidup dalam Suasana Lambung

Kemampuan isolat bakteri untuk bertahan dalam suasana asam di lambung dievaluasi dengan menginkubasi bakteri dalam suasana pH 2,0 sesuai pH lambung selama 3 jam (Hosseini dkk., 2009). Sel bakteri asam laktat dari kultur 24 jam dalam MRS broth dipanen dengan sentrifugasi, dicuci dengan PBS steril (Oxoid, Hampshire UK). Sel bakteri diresuspensi dalam PBS steril yang telah disesuaikan pHnya menjadi pH 2,0 dan diinkubasi pada 37°C selama 3 jam. Jumlah mikroba sebelum dan setelah inkubasi ditentukan pada MRS agar.

Toleransi terhadap Garam Empedu

Kemampuan strain untuk tumbuh pada media mengandung garam empedu ditentukan berdasarkan metode Vinderola dan Reinheimer (2003). Setiap isolat diinokulasi ke dalam MRS broth dan diinkubasi selama 24 jam pada 37°C. Isolat selanjutnya diinokulasi (2% v/v) dalam MRS broth mengandung 0,5% (w/v) garam empedu (Difco). Kultur diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Absorbansi ditentukan pada 560 nm dan dibandingkan dengan kultur yang ditumbuhkan dalam MRS broth tanpa garam empedu.

Aktivitas Antimikroba terhadap Bakteri Enterik

Aktivitas antimikroba diuji dengan menggunakan metode sumur (Pan dkk., 2009). Kultur bakteri enterik dan kultur bakteri asam laktat berusia 18 jam dalam media cair BHI dan MRS, berturut-turut, yang akan dipergunakan dalam uji aktivitas antimikroba, telah disiapkan sebelumnya. Sejumlah 25 µl kultur dari setiap strain indikator disebarkan pada cawan berisi 25 ml Mueller Hinton agar. Sumur berukuran 6 mm dibuat pada agar dan 50 µl kultur bakteri asam laktat yang diuji diinokulasi pada sumur. Setelah inkubasi 24 jam pada 37°C, diameter zona penghambatan diukur dari 3 sisi yang berbeda.

Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan juga pada supernatan yang telah dinetralkan. Kultur bakteri asam laktat

dalam medium cair MRS disentrifugasi pada 10.000 g selama 10 menit. Supernatan yang telah dinaikkan pH-nya menjadi 6,5 dengan NaOH 2 N digunakan dalam metode difusi sumur seperti yang dilakukan pada kultur bakteri asam laktat.

Mikroba uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri-bakteri enterik, yaitu *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. typhimurium*, *E. coli*. Hasil pengukuran diameter penghambatan (setelah dikurangi diameter sumur), diklasifikasikan sebagai berikut: kekuatan penghambatan lemah (0-3 mm), sedang (3-6 mm), kuat (6-9 mm), dan sangat kuat (>9 mm).

Pengujian Resistensi Antibiotik

Pengujian antibiotik dilakukan dengan metode difusi kertas cakram sesuai standar NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998) menggunakan media Mueller Hinton Agar (Oxoid, Hampshire UK). Cakram pengujian resistensi antibiotik (*antibiotic Susceptibility disc*) diperoleh dari Oxoid dan disimpan dalam wadah tertutup yang dilengkapi dengan penyerap kelembaban (*desiccant*) pada 4°C. Pengujian resistensi antibiotik dilakukan terhadap amoksisilin (15 µg/cakram), kloramfenikol (30), siprofloksasin (30), sefadroksil (30), eritromisin (15), streptomisin (30), tetrasiklin (30), trimetoprim/sulfametoksazol (30), dan rifampisin (30). Larutan stok antibiotik sebelumnya telah disterilisasi dengan membran 0,22 µl dan disimpan pada -20°C. Antibiotik yang dipilih mewakili yang berspektrum luas dan terbatas serta mewakili beberapa tipe mode aksi terhadap mikroorganisme.

Cakram pengujian resistensi antibiotik diletakkan di permukaan cawan berisi 20 ml Mueller Hinton Agar yang telah diinokulasi 20 µl isolat bakteri asam laktat, yang sebelumnya telah disegarkan dalam MRSB selama 18 jam dalam 37°C. Sejumlah 10 µl larutan antibiotik diteteskan pada cakram. Setelah inkubasi pada 37°C selama 24 jam, ditentukan ukuran zona penghambatan. Berdasarkan ukuran zona penghambatan, isolat diklasifikasikan sebagai resisten, moderat atau suseptibel terhadap antibiotik, sesuai klasifikasi untuk masing-masing antibiotik dengan mengacu pada NCCLS (1998).

Identifikasi Isolat Menggunakan API (*Analytical Profile Index*) 50 CHL

Identifikasi isolat bakteri asam laktat menggunakan API 50 CHL (Biomérieux) dilakukan sesuai dengan prosedur yang ditentukan oleh produsen. Kultur bakteri yang digunakan adalah yang berusia 24 jam pada cawan berisi MRS agar. Isolat bakteri asam laktat asal *mandai* yang diidentifikasi adalah yang telah melewati penapisan berdasarkan sifat-sifat probiotik, yaitu ketahanan terhadap pH 2.0 dan garam empedu 0,5% serta mempunyai sifat antimikroba yang kuat.

Identifikasi Mikroorganisme dengan Qualitative-PCR

Ekstrak DNA isolat diperoleh dengan modifikasi dari metode Sambrook (2001) sebagai berikut: Sejumlah 1.5 ml kultur isolat berusia 24 jam disentrifus (8000 rpm 3 menit). Pellet yang diperoleh ditambahkan 500 µl buffer TE dan disentrifus (5000 rpm 7 menit). Sejumlah 50 µl buffer TE dan 100 µl lisozim ditambahkan ke pellet, diinkubasi 4°C 5 menit. Ke dalam suspensi ditambahkan 25 µl SDS 10%, 50 µl NaCl 5M, 100 µl proteinase K (20 mg/ml) lalu diinkubasi pada 55°C selama 2 jam.

Suspensi ditambah 500 µl Phenol – Chloroform (PC = 1:1) dan diinkubasi pada -20°C selama 30 menit untuk kemudian disentrifus pada 12000 rpm 10 menit. Supernatan dipindahkan ke *microtube* baru yang steril. Proses penambahan PC, inkubasi dan sentrifugasi diulang sampai 3 kali. Supernatan ditambah 500 µl kloroform dan disentrifus pada 12000 rpm 10 menit. Sejumlah 0,3x volume ammonium asetat 10M pH 7,4 dan 1x volume isopropanol dingin ditambahkan ke dalam supernatan yang telah dipindahkan ke *microtube* baru lalu. Setelah diinkubasi selama 2 jam pada -20°C, suspensi disentrifus pada 14000 rpm selama 30 menit, lalu supernatant dibuang. Pellet ditambah 500 µl etanol 70% dingin dan disentrifus lagi pada 12000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pellet diangin-anginkan. Setelah kering, pellet diresuspensi dengan 50 µl buffer TE dan siap disimpan pada -20°C.

Selanjutnya ekstrak DNA dianalisis dengan qualitative-PCR. Campuran pereaksi untuk q-PCR dibuat sebagai berikut: 10 µl SYBR Green PCR mix, 1 µl templat DNA, 1 µl untuk masing-masing primer, 7 µl air bebas nuklease. Total volume campuran adalah 20 µl. Parameter yang digunakan untuk menjalankan rt-PCR adalah sebagai berikut: Kondisi running PCR yang digunakan adalah denaturasi awal pada 95°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus 95°C 1 menit, 50°C 1 menit, 72°C 2 menit, dan tahap perpanjangan 72°C 7 menit. *Melting* dilakukan dengan suhu awal 72°C dan target suhu akhir 94°C dengan step 0.5°C. Primer yang digunakan adalah 1541R dan 9F (Arief 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkembangan Jumlah Bakteri Asam Laktat selama Fermentasi *Mandai*

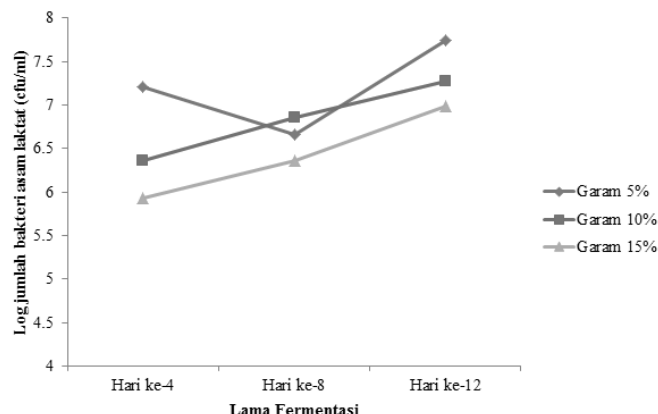
Jumlah bakteri asam laktat pada seluruh sampel meningkat selama fermentasi, kecuali pada kadar garam 5 persen (Gambar 1). Jumlah awal sekitar 6-7 log cfu/ml dan jumlah akhir pada kisaran 7,0-7,7 cfu/ml. Sampai hari ke-12 fermentasi, jumlah bakteri asam laktat masih menunjukkan trend meningkat. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Nur (2009) yang menunjukkan trend peningkatan

jumlah bakteri selama fermentasi *mandai* sampai hari ke-14. Total jumlah bakteri adalah 5 log cfu/ml pada awal fermentasi, 6 log cfu/ml pada hari ke-5 dan 7 log cfu/ml pada hari ke-14.

Konsentrasi garam berpengaruh secara signifikan terhadap jumlah bakteri asam laktat. Semakin tinggi konsentrasi garam yang ditambahkan selama *mandai*, jumlah bakteri asam laktat semakin berkurang. Perbedaan jumlah bakteri asam laktat pada fermentasi *mandai* dengan kadar garam berbeda menunjukkan pengaruh lingkungan terhadap pertumbuhan bakteri asam laktat. Garam dalam fermentasi *mandai* ditambahkan sebagai faktor seleksi lingkungan. Garam dapat menurunkan nilai aw dan meningkatkan potensial reduksi. Dengan adanya garam, mikroorganisme yang dapat tumbuh hanyalah yang dapat mentoleransi garam. Hal serupa juga dilaporkan oleh Bautista-Gallego dkk. (2013) bahwa semakin tinggi garam yang ditambahkan pada fermentasi buah zaitun, jumlah bakteri asam laktat yang dapat tumbuh semakin berkurang.

Pengaruh kadar garam terhadap pertumbuhan bakteri asam laktat selama fermentasi juga dilaporkan oleh Ji dkk. (2007). Pada fermentasi kubis, peningkatan kadar garam diikuti oleh penurunan total hitungan bakteri asam laktat. Penghambatan pertumbuhan bakteri asam laktat sempat terjadi pada konsentrasi garam 8-12% di awal fermentasi untuk kemudian mengalami peningkatan pada akhir fermentasi. Verluyten dkk. (2004) juga melaporkan bahwa pada sosis fermentasi dengan kadar garam NaCl lebih tinggi, pertumbuhan *L. curvatus* LTH 1174 menurun. Garam mempengaruhi pertumbuhan mikroba dengan cara menurunkan ketersediaan air dalam sel. Adanya garam juga menurunkan potensial reduksi sehingga membatasi pertumbuhan mikroorganisme aerobik dan sebaliknya mendukung pertumbuhan mikroorganisme yang bersifat mikroaerofilik dan anaerobik.

Pada hari ke-8, jumlah bakteri asam laktat pada *mandai* dengan kadar garam 5% turun sedangkan pada *mandai* dengan



Gambar 1. Jumlah bakteri asam laktat selama fermentasi *mandai* pada tiga tingkatan kadar garam 5% (♦), 10% (■) dan 15% (▲)

kadar garam 10 dan 15% tetap meningkat. Pada hari ke-12 kecenderungannya sama dengan hari ke-4. Pada *mandai* dengan kadar garam 5% diduga mikroba-mikroba lain masih dapat tumbuh dan menekan pertumbuhan bakteri asam laktat. Akan tetapi dengan berjalannya fermentasi, pertumbuhan bakteri asam laktat kembali meningkat.

Profil Isolat Bakteri Asam Laktat Asal *Mandai*

Isolasi bakteri asam laktat dari *mandai* telah memperoleh 85 isolat dari beberapa waktu fermentasi (Tabel 1). Umumnya isolat bakteri asam laktat mempunyai morfologi batang, 68 isolat, dan bulat atau kokus, 17 isolat. Isolat berbentuk kokus umumnya diperoleh pada hari ke-4 dan 8 fermentasi. Dilihat dari kadar garam dan hari fermentasi, isolat *mandai* lebih banyak diperoleh pada kadar garam 15% dan hari fermentasi ke-8. Banyaknya isolat yang diperoleh pada *mandai* dengan kadar garam 15% mengindikasikan isolat yang bersifat halotoleran atau halofilik.

Isolat yang berbentuk kokus tidak diperoleh lagi pada fermentasi hari ke-12. Diduga pertumbuhan bakteri asam laktat berbentuk kokus mengalami penghambatan pada lingkungan yang asam seperti *mandai* pada hari fermentasi ke-12. Pada tahap fermentasi yang lebih lanjut, pada hari ke-12, metabolit lebih banyak diproduksi, di antaranya asam organik, sehingga menurunkan pH dan membuat suasana menjadi asam. Pada produk *mandai* dalam penelitian ini, setelah 12 hari, pH akhir produk berada pada kisaran 4,16-4,8.

Tabel 1. Jumlah dan morfologi isolat bakteri asam laktat asal *mandai* pada beberapa tahap fermentasi

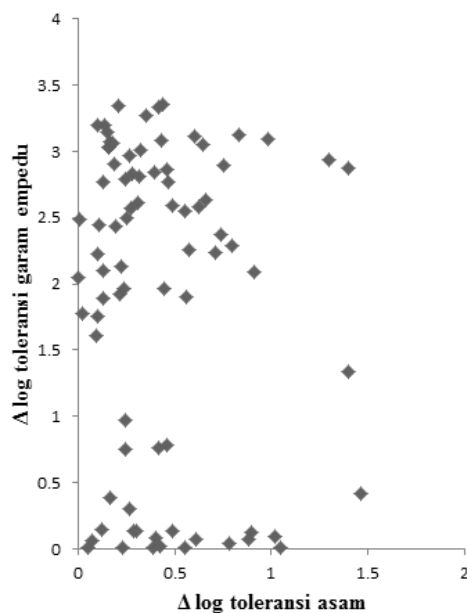
Konsentrasi garam	Lama fermentasi						Jumlah
	Hari ke-4		Hari ke-8		Hari ke-12		
	Kokus	Batang	Kokus	Batang	Kokus	Batang	
Garam 5%	1	3	0	7	0	5	16
Garam 10%	6	10	2	4	0	2	24
Garam 15%	3	3	5	24	0	10	45
Jumlah	10	16	7	35	0	17	85

Ballesteros dkk. (1999) melaporkan bahwa dalam fermentasi Almagro, asam-asam organik telah diproduksi sejak dimulainya fermentasi dan berimplikasi pada penurunan pH. Produksi asam organik dan penurunan pH sejak awal fermentasi juga dilaporkan oleh Roberts dan Kidd (2005) pada fermentasi bawang merah. Dalam laporan sebelumnya, Osmanagaoglu dkk. (2010) melaporkan bahwa *Pediococcus*, yang merupakan salah satu bakteri asam laktat berbentuk kokus, tidak resisten terhadap pH 2, sedangkan Argyri dkk. (2013) melaporkan bahwa *L. mesenteroides*, yang merupakan juga bakteri asam laktat berbentuk kokus, ditemukan

jumlahnya turun hingga di bawah 1 log cfu/ml setelah 3 jam dipapar pada pH 2,5.

Kemampuan Mentoleransi Asam Lambung dan Garam Empedu

Hampir semua isolat bakteri asam laktat asal *mandai* mempunyai kemampuan mentoleransi keasaman lambung ditandai dengan kemampuan bertahan hidup selama 3 jam pada pH 2, dengan penurunan jumlah bakteri hingga 1 log cfu/ml (Gambar 2). Nilai pH lambung adalah 2-3 dan lama waktu transit adalah 2-3 jam. Kemampuan mentoleransi pH 2 diduga berhubungan dengan lingkungan asal isolat (yaitu *mandai*), yang pH akhir produknya setelah fermentasi 12 hari adalah 4,16-4,8.



Gambar 2. Kemampuan isolat bakteri asam laktat asal *mandai* mentoleransi kondisi keasaman lambung (pH 2,0) dan empedu (0,5%)

Kemampuan mentoleransi 0,5% empedu ditunjukkan hanya oleh 21 isolat (Gambar 2), ditandai oleh kemampuan untuk tumbuh dan memperbanyak diri dalam media yang mengandung 0,5% empedu, dengan selisih jumlah di bawah 2 log dibandingkan dengan pertumbuhan isolat yang sama dalam media yang tidak mengandung empedu. Kemampuan mentoleransi empedu 0,5% merupakan karakteristik yang penting dimiliki oleh bakteri probiotik sebab merupakan prasyarat untuk dapat melewati saluran pencernaan dan sampai di kolon.

Bautista-Gallego dkk. (2013) melaporkan sebaliknya, bahwa kemampuan mentoleransi garam empedu pada isolat-isolat bakteri asam laktat asal zaitun terfermentasi (*fermented table olive*) lebih baik daripada kemampuan mentoleransi

asam lambung. Demikian juga Vidhyasagar dan Jeevaratnam (2013) melaporkan bahwa 4 dari 6 isolat bakteri asam laktat dari *idly* yang dapat mentoleransi asam juga dapat mentoleransi empedu 0,3%.

Jumlah total isolat yang mampu mentoleransi asam dan empedu dengan total maksimum penurunan jumlah bakteri sebesar 1 log cfu/ml adalah 19 isolat. Kesembilanbelas isolat ini yang akan diteruskan dalam analisis selanjutnya.

Aktivitas Antimikroba terhadap Bakteri Patogen

Dari pengujian terhadap 19 isolat yang mempunyai toleransi asam dan garam empedu, sepuluh di antaranya mempunyai aktivitas antimikroba yang kuat terhadap tiga atau lebih bakteri uji (Tabel 2). Isolat MC812 mempunyai sifat antimikroba yang kuat terhadap semua bakteri uji. Isolat MB411, MB427, MA314, M325 dan M337 bersifat antimikroba hanya terhadap tiga bakteri uji. Akan tetapi supernatannya yang telah dinetralkan tidak mempunyai atau hanya mempunyai aktivitas antimikroba yang lemah terhadap bakteri uji. Diduga aktivitas antimikroba ini disebabkan oleh penurunan pH karena produksi asam-asam organik selama fermentasi seperti asam laktat dan asam asetat (Vitali dkk. 2012) dan bukan karena produksi substansi antimikroba seperti bakteriosin.

Tabel 2. Isolat bakteri asam laktat asal *mandai* yang mempunyai aktivitas antimikroba yang kuat terhadap tiga atau lebih isolat

Isolat	Aktivitas antimikroba terhadap				
	<i>L.monocytogenes</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.typhimurium</i>
MC802	V	V		V	V
MC804	V	V	V	V	
MC804	V	V	V	V	
MC805	V	V	V		V
MC807	V		V	V	V
MC809	V	V	V	V	V
MC812	V	V	V	V	V
MB411	V	V			V
MB427	V	V		V	
MA314	V		V	V	
M325	V			V	V
M337	V		V	V	

Beberapa penelitian juga melaporkan hasil serupa. Argyri dkk. (2013) melaporkan bahwa tak satupun supernatan bebas sel dari isolat bakteri asam laktat asal zaitun terfermentasi, yang mempunyai aktivitas antimikroba. Demikian juga isolat-isolat *Lactobacillus* asal susu yang dilaporkan Maragkoudakis dkk. (2006) tidak lagi bersifat antimikroba pada pH netral.

Dari kelima bakteri uji, ke-10 isolat bakteri asam laktat asal *mandai* lebih bersifat menghambat terhadap *L. monocytogenes* dan *E. coli*. Diduga pertumbuhan *L. monocytogenes* lebih dihambat karena sensitivitasnya terhadap adanya asam organik seperti asam laktat. Wilson dkk. (2005) melaporkan aktivitas antilisterial *L. plantarum* SK1 terjadi pada akhir fase log dari pertumbuhannya yang dihubungkan dengan turunnya pH media pertumbuhan sampai 4.26. Rendahnya pertumbuhan juga teramati saat *L. monocytogenes* ditumbuhkan pada supernatan dari media pertumbuhan *L. plantarum* yang diadjust pH-nya dengan penambahan asam laktat.

Resistensi terhadap Antibiotik

Resistensi antibiotik merupakan salah satu indikator keamanan kandidat probiotik. Semua isolat bakteri asam laktat asal *mandai* bersifat resisten (R) terhadap semua antibiotik yang diujikan kecuali streptomisin (Tabel 3). Beberapa isolat sensitif terhadap amoksisilin dan eritromisin. Dilihat dari mode aksi antibiotik, seluruh isolat bakteri yang diujikan resisten terhadap tipe antibiotik inhibitor metabolisme folat (trimetoprim/sulfametoksazol), inhibitor sintesis dinding sel (sefadroksil dan amoksisilin), inhibitor sintesis DNA (siprofloksasin) dan RNA (rifampisin). Isolat-isolat bakteri asam laktat asal *mandai* bervariasi resistensinya terhadap antibiotik tipe inhibitor sintesis protein. Isolat bakteri asam laktat sensitif terhadap streptomisin, resisten terhadap tetrasiklin dan kloramfenikol, namun resistensinya terhadap eritromisin bervariasi.

Tabel 3. Resistensi beberapa isolat bakteri asam laktat asal *mandai* terhadap beberapa antibiotik

Isolat	Amx	Tri/Sm	Tec	Chl	Rpn	Cfdx	Ern	Strn	CfpX
MC802	R	R	R	R	R	R	R	S	R
MC804	R	R	R	R	R	R	R	S	R
MC805	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MC807	R	R	R	R	R	R	R	S	R
MC812	R	R	R	R	R	R	R	S	R
MC314	R	R	R	R	R	R	S	S	R
MC411	S	R	R	R	R	R	S	S	R
MC427	S	R	R	R	R	R	R	S	R
MC325	R	R	R	R	R	R	R	S	R
MC337	S	R	R	R	R	R	R	S	R

Keterangan:

R: resisten, S: Suseptibel, Amx: Amoxicillin, Tri/Sm: Trimetoprim/Sulphamethoxazole, Tec: Tetracyclin, Chl:Chloramphenicol, Rpn: Rifampicin, Cfdx: Cefadroxil, Ern: Erythromicin, Strn:Streptomycin, CfpX: Ciprofloxacin

Resistensi bakteri asam laktat terhadap antibiotik telah banyak dilaporkan. Argyri dkk. (2013) melaporkan bahwa bakteri asam laktat resisten terhadap tetrasiklin dan eritromisin. Resistensi tinggi terhadap rifampisin, siprofloksasin dan trimetoprim/sulfametoksazol serta sensitivitas terhadap streptomisin, juga dilaporkan oleh Liu dkk. (2009). Resistensi terhadap antibiotik menjadi perhatian dan tidak dikehendaki sebab diduga berbasis genetik dan dikhawatirkan terdapat potensi untuk dipindahkan kepada mikroorganisme lain.

Dugaan adanya potensi tranfer gen resistensi antibiotik perlu diklarifikasi lebih lanjut. Menurut Mathur dan Singh (2005), resistensi antibiotik bakteri asam laktat ada yang bersifat intrinsik dan perolehan (*acquired*). Resistensi antibiotik yang bersifat intrinsik merupakan resistensi yang bersifat alami, disandikan dalam kromosom, diturunkan pada saat membelah diri dan tidak dipindahkan pada spesies lain. Resistensi yang bersifat intrinsik dapat disebabkan oleh komposisi tertentu pada dinding sel sehingga tidak mudah dilemahkan oleh antibiotik. Diduga resistensi isolat bakteri asam laktat asal *mandai* terhadap beberapa antibiotik dengan mode aksi terhadap dinding sel (seperti sefadroksil dan amoksisilin) bersifat intrinsik.

Resistensi intrinsik laktobasili terhadap siprofloksasin, streptomisin, trimetoprim/sulfametoksazol dilaporkan oleh Danielsen dan Wind (2003). Ouoba dkk. (2008) yang menginvestigasi resistensi antibiotik terhadap beberapa strain bakteri asam laktat asal Afrika dan Eropa, melaporkan resistensi terhadap antibiotik yang bersifat intrinsik dengan tidak ditemukannya gen resisten terhadap antibiotik tertentu.

Berbeda dengan resistensi intrinsik, resistensi yang bersifat perolehan disandikan di plasmid dan dapat dipindahkan secara horisontal ke spesies lain. Laktobasili dapat mempunyai plasmid dan dapat dipindahkan secara konjugasi (Mathur dan Singh 2005). Gen *tet* dan *erm* (menyandi resistensi terhadap tetrasiklin dan eritromisin) pada plasmid dilaporkan pada beberapa laktobasilli yang diisolasi dari manusia dan susu, yaitu *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri* dan *L. plantarum* yang menunjukkan adanya antibiotik dapatan (Cataloluk dan Gogebaken 2004). Dalam penelitian ini, isolat bakteri asam laktat asal *mandai* juga ditemukan bersifat resisten terhadap tetrasiklin dan eritromisin, hanya belum diketahui apakah resistensi bersifat intrinsik atau perolehan. Untuk memastikan bakteri asam laktat asal *mandai* aman dikonsumsi manusia dari sisi resistensi antibiotik, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat potensi transfer gen resistensi pada spesies lain.

Ouoba dkk. (2008) melakukan sekuensing terhadap beberapa gen resistensi antibiotik dari beberapa spesies *Lactobacillus*. Hanya gen resistensi eritromisin pada *L. reuteri* 12002 yang mengandung sekuen homolog dengan

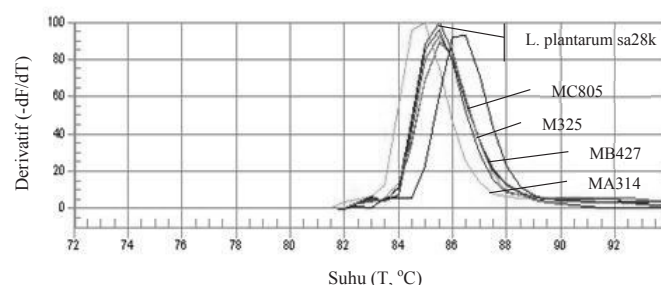
gen resistensi yang sudah didaftarkan pada *genebank*, mengindikasikan gen *erm* pada *L. reuteri* 12002 dapat diperoleh sebagai resistensi perolehan. Homologi dengan gen resistensi antibiotik lain seperti tetrasiklin, amoksisilin, kloramfenikol, siprofloksasin, streptomisin, trimetoprim/sulfametoksazol, tidak ditemukan pada beberapa spesies *Lactobacillus* yang diuji. Hasil ini mengindikasikan bahwa resistensi spesies *Lactobacillus* terhadap beberapa jenis antibiotik lain bersifat intrinsik. Gen resistensi terhadap eritromisin tidak ditemukan pada *Lactobacillus* selain *L. reuteri* 12002 mengindikasikan bahwa resistensi terhadap eritromisin selain dapat bersifat didapatkan juga dapat bersifat intrinsik serta bersifat spesifik spesies.

Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat yang Potensial sebagai Probiotik

Dengan menggunakan API 50 CHL, kesepuluh isolat bakteri asam laktat asal *mandai* diidentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* dengan persen identitas di atas 99% (Tabel 4). Hanya isolat MA314 memiliki persen identitas 99.4% sedangkan sembilan isolat yang lain memiliki persen identitas 99.9%. Hasil ini dikonfirmasi dengan membandingkan profil kurva pelelehan ekstrak DNA dari sepuluh isolat asal *mandai* yang dianalisis dengan q-PCR secara kualitatif. Analisis pelelehan dilakukan setelah tiga tahapan PCR dilakukan, yaitu denaturasi, penempelan (*annealing*) dan perpanjangan untai DNA (*elongasi*). Pola dan suhu pelelehan yang diperoleh dibandingkan dengan pola dan suhu pelelehan bakteri standar yang telah diketahui identitasnya yaitu *Lactobacillus plantarum* BSL. Bakteri standar dipilih berdasarkan dugaan identitas spesies dari hasil identifikasi dengan API 50 CHL yaitu *L. plantarum*.

Tabel 4. Hasil identifikasi beberapa isolat bakteri asam laktat asal *mandai* yang berpotensi sebagai kandidat probiotik

Isolat	Teridentifikasi sebagai	% ID
MC802	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.90%
MC804	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.90%
MC805	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.90%
MC807	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.90%
MC812	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.90%
MB411	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.90%
MB427	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.90%
MA314	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.40%
M325	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.90%
M337	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.90%



Gambar 3. Kurva melting beberapa isolat bakteri asam laktat asal *mandai* dibandingkan dengan kurva melting *Lactobacillus plantarum* sa28k sebagai bakteri standar

Dalam Gambar 3, *L. plantarum* BSL memiliki kurva pelelehan yang hampir berhimpitan dan menunjukkan kesamaan pola dengan kurva pelelehan beberapa isolat bakteri asam laktat asal *mandai* yang sebelumnya telah diidentifikasi dengan API 50 CHL. Kurva pelelehan yang hampir berhimpit mengindikasikan kesamaan pola dan suhu pelelehan, yaitu 85.5°C. Suhu pelelehan dilihat dari suhu pada puncak kurva pelelehan. Kesamaan pola kurva dan suhu pelelehan menjadi dasar identifikasi sebagai spesies yang sama (Hagen dkk., 2005). Kurva pelelehan isolat MA314, meskipun mempunyai kesamaan pola dengan kurva pelelehan *L. plantarum* BSL, akan tetapi bergeser 0.5°C ke kiri dibandingkan dengan kurva pelelehan *L. plantarum* BSL. Perbedaan ini dapat diduga sebagai spesies yang berbeda atau hanya strain yang berbeda. Dalam konfirmasi identitas *Cronobacter sakazaki*, menggunakan q-PCR, beberapa strain yang sebelumnya telah diketahui identitasnya sebagai *C. sakazaki* secara molekuler, akan tetapi berbeda strain, dapat menunjukkan perbedaan suhu pelelehan hingga 0.5°C (Jenie dkk., 2014).

Identifikasi isolat kandidat probiotik harus dilakukan hingga level strain dengan sekuensing atau penentuan urutan basa pada gen yang menyandikan 16S rRNA. Dari urutan basa yang diperoleh dapat diketahui identitas bakteri dengan cara membandingkan dengan data yang sudah ada di *genebank*.

KESIMPULAN

Sejumlah 19 isolat bakteri asam laktat asal *mandai* mempunyai kemampuan mentoleransi lingkungan ber-pH 2 dan mengandung 0,5% garam empedu dengan penurunan pertumbuhan sampai 1 log cfu/ml dibandingkan lingkungan berpH netral tanpa garam empedu. Sepuluh di antara isolat bakteri asam laktat mempunyai sifat antimikroba baik terhadap tiga dari lima bakteri yang diujikan. Isolat MC812 mempunyai aktivitas antimikroba yang baik terhadap semua bakteri uji. Umumnya sepuluh isolat bakteri asam laktat asal *mandai* bersifat resisten terhadap 8 antibiotik yang diujikan dan bersifat sensitif terhadap streptomisin. Berdasarkan

identifikasi dengan API 50 CHL dan dikonfirmasi dengan rt-PCR, kesepuluh isolat asal *mandai* termasuk *Lactobacillus plantarum*. Berdasarkan hasil karakterisasi yang telah dilakukan, sepuluh isolat *L. plantarum* asal *mandai* dapat dipertimbangkan sebagai kandidat probiotik.

DAFTAR PUSTAKA

- Arief, I.I. (2011). *Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Indigenus Asal Daging Sapi sebagai Probiotik dan Identifikasinya dengan Analisis Urutan Basa Gen 16SrRNA*. Disertasi Program Doktor, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.G. Tsakalidou, E., Nychas, G.E., Panagou, E.Z. dan Tassou, C.C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology* **33**: 282-291.
- Balitbangkes. (2007). *Riset Kesehatan Dasar*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Balesteros, C., Palop, L. dan Sanchez, I. (1999). Influence of sodium chloride concentration on the controlled lactic acid fermentation of "Almagro" eggplants. *International Journal of Food Microbiology* **53**: 13-20.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-Lopez, F.N., Rantsiou, K. dan Jimenez-Diaz, R. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research Internaional* **50**: 135-142.
- Culligan, E.P., Hill, C. dan Sleator, R.D. (2009). Probiotics and gastrointestinal disease: Successes, problems, and future prospects. *Gut Pathogens* **1**: 19.
- Danielsen M dan Wind A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology* **82**(1): 1-11.
- [FAO/WHO] Food Agricultural Organization/World Health Organization. (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Ontario, Canada.
- Hagen, R.M., Seegmueller, I., Navai, J., Kappstein, I., Lehn, N. dan Miethke, T. (2005). Development of a real-time PCR assay for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples. *International Journal of Medical Microbiology* **295**: 77-86.
- Hosseini, S.V., Arlindo, S., Bohme, K., Fernandez-No, C., Calo-Mata, P. dan Barros-Velazques, J. (2009). Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 1392-1403.
- Ji, F., Ji, B., Li, B. dan Han, B. (2007). Microbial changes during the salting process of traditional pickled Chinese cabbage. *Food Science and Technology International* **13**: 11-16.
- Liu, C., Zhancg, Z., Dong, K., Yuan, J. dan Guo, X. (2009). Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomedical and Environmental Sciences* **22**: 401-412.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. dan Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* **16**: 189-199.
- Mathur S. dan Singh R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *International Journal of Food Microbiology* **105**: 281-295
- Maturin, L. dan Peeler, J.T. (2001). *Aerobic plate count. Dalam: Bacteriological Analytical Manual*. US. Food and Drug Administration, New Hampshire, MD.
- [NCCLS] National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1998). *Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test*. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Nur, H.S. (2009). Sukses mikroba dan aspek biokimia fermentasi *mandai* dengan kadar garam rendah. *Makara* **13**(1): 13-16.
- Osmanagaoglu, O., Kiran, F. dan Ataoglu, H. (2010). Evaluation of in vitro probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF isolated from human breast milk. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **2**: 162-174.
- Ouoba, L.I.I.O., Lei, V. dan Jensen, L.B. (2008). Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **121**: 218-224.
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H. dan Zhao, Z. (2009). The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control* **20**: 598-602.
- Rahayu, E.S. (2003). Lactic acid bacteria in fermented foods of Indonesian origins. *Agritech* **23**: 75-84.

- Roberts, J.S. dan Kidd, D.R. (2005). Lactic acid fermentation of onions. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* **38**: 185-190.
- Sambrook, J. dan Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Stuart, C.H., Schwartz, S.A., Beeson, T.J. dan Owatz, C.B. (2006). *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics* **32**: 93-98.
- Todar, K. (2008). *Listeria*. Dalam: Online Textbook of Bacteriology, www.textbookofbacteriology.net. [27 Januari 2014].
- Vasiljevic, T. dan Shah, N.P. (2008). Probiotics -from Metchnikoff to bioactive. *International Dairy Journal* **18**: 714-728.
- Verluyten, J., Messens, W. dan De Vuyst, L. (2004). Sodium chloride reduces production of curvacin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* strain LTH 1174, originating from fermented sausage. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(4): 2271-2278.
- Vinderola, C.G. dan Reinheimer, J.A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* **36**: 895-904.
- Vidhyasagar, V. dan Jeevaratnam, K. (2013). Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. *Journal of Functional Food* **5**: 235-243.
- [WHO] World Health Organization. (2008). *The Global Burden of Disease: 2004 Update*. World Health Organization Press, Geneva.